

**PCT**ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE  
Bureau international

## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :</b> <b>C12N 15/52, 9/00, C07H 21/00, A61K 31/70 // C07K 14/47</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale: WO 96/35791</b> <b>(43) Date de publication internationale: 14 novembre 1996 (14.11.96)</b>
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR96/00691 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 9 mai 1996 (09.05.96) <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 95/05468 9 mai 1995 (09.05.95) <b>FR</b> <b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> SANOFI [FR/FR]; 32-34, rue Marbeuf, F-75008 Paris (FR). <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement):</b> ESCANDE, Jean-Paul [FR/FR]; 1, avenue de Paris, F-91670 Angerville (FR). AL-MAHMOOD, Salman [IQ/FR]; 20, rue des Rasselins, F-75020 Paris (FR). LUGASSY, Claire [FR/FR]; 23, rue Sainte Apolline, F-75002 Paris (FR). <b>(74) Mandataires:</b> GILLARD, Marie-Louise etc.; Cabinet Beau de Loménie, 158, rue de l'Université, F-75007 Paris (FR).		<b>(81) Etats désignés:</b> AL, AM, AT, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, brevet ARIPO (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), brevet eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>
<b>(54) Title:</b> DNA SEQUENCE, CODING FOR A RIBOZYME, USEFUL AS A DRUG, AND PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS CONTAINING SAME <b>(54) Titre:</b> SEQUENCE D'ADN CODANT POUR UN RIBOZYME A TITRE DE MEDICAMENT, ET COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES LA CONTENANT <b>(57) Abstract</b> Nucleic acid sequence for a "hammerhead" ribozyme against the insulin receptor substrate (IRS-1), and selected from the following: (a) 5'-TCGATGTGAC GCTACTGATG AGTCCGTGAG GACAAACTC TGGCCTAG-3', (b) fragments of (a) with at least 21 bases; and (c) nucleic acid sequences which hybridise under stringent conditions with (a) or (b), for use as a therapeutically active substance. Pharmaceutical compositions containing said sequence and the use thereof for treating tumours, alopecia, angiogenesis or baldness are als described. <b>(57) Abrégé</b> La présente invention concerne une séquence d'acide nucléique codant pour un ribozyme "hammerhead" dirigé contre le substrat du récepteur de l'insuline (IRS-1) et choisie parmi: (a) 5' -TCGATGTGAC GCTACTGATG AGTCCGTGAG GACGAAACTC TGGCCTAG-3'; (b) les fragments de (a) qui comportent au moins 21 bases; et (c) les séquences d'acide nucléique qui hybrident dans des conditions strictes avec (a) ou (b), pour son utilisation comme substance thérapeutiquement active. L'invention concerne également les compositions pharmaceutiques contenant ladite séquence, et leur utilisation pour le traitement de tumeurs, de l'alopecie, de l'angiogenèse ou de la calvitie.		

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Béain	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brésil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

**SEQUENCE D'ADN CODANT POUR UN RIBOZYME A TITRE DE MEDICAMENT, ET COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES LA CONTENANT**

La présente invention concerne le domaine médical. Plus particulièrement, l'invention concerne une séquence d'acide nucléique comme substance  
5 thérapeutiquement active. L'invention concerne également les compositions pharmaceutiques contenant ladite séquence.

L'adhésion des cellules sur les composants de la matrice extracellulaire est un point central dans la biologie du vivant. En pathologie humaine, et spécialement dans le domaine du cancer, ce phénomène tient un rôle crucial dans le développement de  
10 la maladie. Il est en effet impliqué dans la migration des cellules cancéreuses, dans le phénomène d'invasion ainsi que dans la colonisation métastatique à distance.

Des travaux concernant l'interaction cellule-matrice extracellulaire ont d'abord permis de mettre en évidence une inhibition de l'activité phosphatasique membranaire des cellules de mélanome malin humain après interaction de ces  
15 cellules avec des séquences spécifiques de la matrice extracellulaire, telle que les séquences RGDS (séquence Arg-Gly-Asp-Ser, présente dans le collagène, la fibronectine, la vitronectine, la thrombospondine, etc...) et YIGSR (séquence Tyr-Ile-Gly-Ser-Ar présente dans la laminine) (J. Invest. Dermatol., 1994, 102, N°619, 627 ; J. Cellul. Biochem., 1994, 18D, QZ 300, 89 ; J. Clin. Experim. Metast., 1994, 12, N°95, 37).

Des travaux ultérieurs ont montré que cette inhibition survient dans le cadre d'une opération de signalisation cellulaire impliquant une protéine tyrosine kinase. En utilisant des inhibiteurs de cette famille d'enzymes, il est possible, en effet, de supprimer l'effet inhibiteur de la séquence RGDS ou de la séquence YIGSR vis-à-  
25 vis de l'activité phosphatasique des cellules de mélanome humain (J. Clin. Experim. Metast., 1994, 12, N°134, 50-51).

La phosphatase impliquée lors de la réaction s'est révélée être de type Sérine/Thréonine protéine phosphatase. Son poids moléculaire est de 190 kDa. L'inhibition de cette enzyme résulte d'une phosphorylation au niveau de la  
30 tyrosine.

Cette protéine est déjà connue en tant que substrat du récepteur à l'insuline (dénommé IRS-1). Elle a été, en effet, partiellement repérée et étudiée par certains auteurs travaillant sur le diabète (Quon et al., J. Biol. Chem. (1994), 269 (45), 27920-27924).

35 Ces auteurs ont étudié le rôle de l'IRS-1 sur (i) la translocation du GLUT 4 stimulée par l'insuline et (ii) le transport du glucose, dans des cellules adipeuses de

rat. Pour ce faire, ils ont construit un plasmide contenant un oligonucléotide bicaténaire, obtenu à partir de l'oligonucléotide sens 5'-TCGATGTGAC GCTACTGATG AGTCCGTGAG GACGAAACTC TGGCCTAG- 3', et l'ADNc codant pour l'IRS-1 humain, et ont transfecté des cellules adipeuses de rat par ce plasmide.

- 5 On a maintenant mis en évidence le fait que cette protéine de 190kDa est également présente au niveau des cellules tumorales. De plus, on a trouvé de manière surprenante que l'oligonucléotide ci-dessus (SEQ ID N° 1) : 5'-TCGATGTGAC GCTACTGATG AGTCCGTGAG GACGAAACTC TGGCCTAG- 3' possède une activité anti-tumorale remarquable.
- 10 La présente invention concerne donc une séquence d'acide nucléique choisie parmi :
- (a) 5'-TCGATGTGAC GCTACTGATG AGTCCGTGAG GACGAAACTC TGGCCTAG- 3' (SEQ ID N° 1)
- (b) les fragments de (a) qui comportent au moins 21 bases ; et
- 15 (c) les séquences d'acide nucléique qui hybrident dans des conditions strictes avec (a) ou (b),
- pour son utilisation comme substance thérapeutiquement active.
- Avantageusement, tout ou partie des liaisons phosphodiester des séquences (a), (b) ou (c) sont protégées. Cette protection s'effectue généralement par voie chimique,
- 20 selon des méthodes classiques bien connues de l'homme du métier. Par exemple, on peut protéger les liaisons phosphodiester par une fonction thiol ou amine ou bien encore par un groupe phényle.
- De façon également avantageuse, les extrémités 5'- et/ou 3'- des séquences ci-dessus sont protégées, par exemple en utilisant la technique indiquée
- 25 précédemment pour protéger les liaisons phosphodiester.
- A titre d'exemples de séquence (b), on peut mentionner les oligonucléotides suivants (SEQ ID N° 2 à SEQ ID N° 21) :
- 5'-TCGATGTGAC GCTACTGATG AGTCCGTGAG GACGAAACTC TGGCC- 3'
- 5'-TCGATGTGAC GCTACTGATG AGTCCGTGAG GACGAAACTC TG- 3'
- 30 5'-TCGATGTGAC GCTACTGATG AGTCCGTGAG GACGAAACT- 3'
- 5'-TCGATGTGAC GCTACTGATG AGTCCGTGAG GACGAA- 3'
- 5'-TCGATGTGAC GCTACTGATG AGTCCGTGAG GAC- 3'
- 5'-TCGATGTGAC GCTACTGATG AGTCCGTGAG- 3'
- 5'-TCGATGTGAC GCTACTGATG AGTCCGT- 3'
- 35 5'-TCGATGTGAC GCTACTGATG AGTC- 3'
- 5'-TCGATGTGAC GCTACTGATG A- 3'

- 5'-ATGTGACGCT ACTGATGAGT CCGTGAGGAC GAAACTCTGG CCTAG- 3'  
 5'-TGACGCTACT GATGAGTCCG TGAGGACGAA ACTCTGGCCT AG- 3'  
 5'-CGCTACTGAT GAGTCCGTGA GGACGAAACT CTGGCCTAG- 3'  
 5'-TACTGATGAG TCCGTGAGGA CGAAACTCTG GCCTAG- 3'  
 5'-TGATGAGTCC GTGAGGACGA AACTCTGGCC TAG- 3'  
 5'-TGAGTCCGTG AGGACGAAAC TCTGGCCTAG- 3'  
 5'-GTCCGTGAGG ACGAAACTCT GGCCTAG- 3'  
 5'-CGTGAGGACG AACTCTGGC CTAG- 3'  
 5'-GAGGACGAAA CTCTGGCCTA G- 3'  
 5'-TACTGATGAG TCCGTGAGGA C-3'  
 5'-TGATGAGTCC GTGAGGACGA A-3'

Les séquences d'acide nucléique (a), (b) et (c) peuvent être synthétisées selon les techniques conventionnelles bien connues de l'homme du métier, par exemple à l'aide d'un synthétiseur d'ADN commercialisé par la Société Biosearch Inc., USA.

- Les séquences d'acide nucléique selon l'invention bloquent la multiplication des cellules, notamment des cellules tumorales *in vivo*. Bien que leur mécanisme d'action ne soit pas entièrement élucidé, on pense qu'elles inhibent l'adhésion des cellules cancéreuses à la matrice extracellulaire. Dans la mesure où on a mis en évidence que la séquence d'acide nucléique (a) est un oligonucléotide antisens dirigé contre le gène de la protéine de 190 kDa mentionnée ci-dessus, on peut alors émettre l'hypothèse selon laquelle la protéine 190 kDa représente le carrefour où se rejoignent les voies de signalisation dépendantes des intégrines (protéines membranaires responsables de l'adhésion des cellules sur la matrice extracellulaire) et celles impliquant la réponse aux hormones et facteurs de croissance.

- Les séquences d'acide nucléique selon l'invention sont donc indiquées comme agent anti-multiplication cellulaire, en particulier comme agent anti-tumoral. Elles sont également indiquées comme agent anti-angiogénèse.

- L'invention concerne par conséquent également une méthode pour inhiber la multiplication des cellules tumorales, notamment des cellules de mélanome humain, qui consiste à administrer aux patients qui en ont besoin une quantité efficace de la séquence d'acide nucléique (a), (b) ou (c).

L'invention concerne aussi une méthode de traitement du cancer, en particulier des mélanomes, qui consiste à administrer aux patients qui en ont besoin une quantité efficace de la séquence d'acide nucléique (a), (b) ou (c).

On a par ailleurs constaté la repousse des poils chez des souris nude traitées avec les séquences d'acides nucléiques selon l'invention. Celles-ci sont donc également indiquées dans le traitement de la calvitie et de l'alopecie.

L'invention concerne donc aussi une méthode de traitement de l'alopecie qui  
5 consiste à administrer aux patients qui en ont besoin une quantité efficace de la séquence d'acide nucléique (a), (b) ou (c).

Selon un autre aspect, l'invention concerne aussi un outil de laboratoire constitué par une séquence d'acide nucléique telle que définie ci-dessus, notamment pour  
10 l'étude *in vitro* des voies de signalisation impliquant la protéine 190 kDa (par exemple sur des cellules, tumorales ou non, transfectées par une des séquences (a), (b) ou (c)), mais également pour l'étude *in vivo* des voies de signalisation impliquant la protéine 190 kDa dans un grand nombre de phénomènes physiologiques et pathologiques (tels que la cancérogénèse), essentiellement à partir du rapport kinase/phosphatase.

15 Les séquences d'acide nucléique selon l'invention sont notamment des principes actifs de compositions pharmaceutiques, dont la toxicité est compatible avec leur utilisation en tant que médicaments.

Ainsi, selon un autre aspect, la présente invention concerne des compositions pharmaceutiques contenant, en tant que principe actif, une séquence d'acide  
20 nucléique telle que définie précédemment, mélangée avec tout excipient pharmaceutiquement acceptable.

Les compositions ci-dessus sont plus particulièrement réalisées de manière à pouvoir être administrées par voie sous-cutanée, intramusculaire, intraveineuse ou transdermique. Pour une telle administration, on utilise notamment des  
25 suspensions aqueuses, des solutions salines isotoniques ou des solutions stériles et injectables qui contiennent des agents de dispersion et/ou des agents mouillants pharmacologiquement compatibles, par exemple le propylèneglycol ou le butylèneglycol.

La dose unitaire usuelle à administrer contient généralement de 0,01 mg à 50 mg  
30 de principe actif.

L'invention est illustrée par les exemples ci-après, dans lesquels on désigne par "oligonucléotide" ou "oligonucléotide (a)" la séquence d'acide nucléique (a).

Exemple 1 : mise en évidence de la protéine 190 kDa dans les cellules tumorales humaines

35 La protéine 190 kDa a été mise en évidence de la manière suivante :

Des cellules issues de mélanome humain, préparées selon la méthode décrite dans J. Inv. Dermatol., 1991, 96, N°2, 238-242, sont mises en suspension dans un tampon phosphate (PBS) contenant 200 µg/ml soit de RGDS, soit de YIGSR, à raison de  $2 \times 10^7$  cellules/ml. Cette suspension cellulaire est ensuite incubée à température ambiante pendant 30 min. Après cette incubation, les cellules sont récupérées par centrifugation à 1000 g pendant 10 min. et sont mises en suspension dans un tampon de lyse cellulaire contenant de l'orthovanadate de sodium. Cette solution est ensuite clarifiée par centrifugation à 14 000 g pendant 15 min. Le surnageant ainsi obtenu est utilisé pour extraire les protéines phosphorylées au niveau de la tyrosine. Cette extraction est réalisée après une immunoprécipitation à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-phosphotyrosine (Sigma). Après addition de l'anticorps anti-phosphotyrosine, le surnageant est incubé pendant 2 h à température ambiante puis centrifugé à 14 000 g pendant 15 min. Le précipité obtenu est repris avec une solution d'électrophorèse contenant 2 % SDS et 15 mM de dithiothréitol, chauffé à 100° C pendant 5 min. puis déposé en gel de polyacrylamide (gradient de 4 à 15 % en acrylamide) dans des conditions dénaturantes (en présence de 2 % SDS). Après migration et révélation du gel par le nitrate d'argent, on constate la présence d'une protéine de poids moléculaire 190 kDa dans les préparations issues des cellules de mélanome traitées avec le RGDS ou traitées avec le YIGSR ; cette protéine est absente de la préparation issue des cellules de mélanome incubées seulement dans du PBS.

**Exemple 2 :** Evaluation de l'activité *in vitro* de l'oligonucléotide (a)

Des cellules de mélanome humain (cf. exemple 1) sont transfectées par l'oligonucléotide.

La transfection est réalisée de la façon suivante : les cellules de mélanome humain sont mises en suspension dans une solution d'oligonucléotide dans le PBS à raison de 100 µg d'oligonucléotide/ml de PBS. La suspension est alors incubée à température ambiante pendant 2 heures. Après incubation, les cellules sont récupérées par centrifugation à 1000 g pendant 10 minutes.

On a ensuite testé l'effet de la transfection par l'oligonucléotide des cellules de mélanome humain sur l'adhésion de ces cellules à une matrice extracellulaire : le Matrigel (commercialisé par la Société Becton Dickinson), dans les conditions suivantes :

A partir d'une solution de Matrigel (10 mg/ml) dans le PBS, des échantillons ont été placés dans une plaque de microtitration à 96 puits à raison de 50 µl/puits. La plaque est incubée à 37° C pendant 2 h puis lavée trois fois avec un tampon

phosphate (PBS) pour éliminer le produit non adsorbé. Les cellules de mélanome (transfectées par l'oligonucléotide pour les tests, ou non transfectées pour les contrôles) qui se trouvent en suspension dans du tampon phosphate (PBS) à raison de  $10^6$  cellules/ml, ont été distribuées à raison de 50  $\mu$ l/puits. Après élimination  
5 des cellules non adhérentes par trois lavages au tampon phosphate (PBS), la densité optique obtenue pour les puits contenant des cellules transfectées par l'oligonucléotide est comparée avec celle obtenue pour les puits contenant des cellules non transfectées.

A la lecture des résultats, il apparaît alors que la transfection des cellules de  
10 mélanome humain par l'oligonucléotide inhibe l'adhésion de ces cellules sur le Matrigel.

Lorsque l'on tente de cultiver les cellules de mélanome humain après transfection par l'oligonucléotide on observe une inhibition de la multiplication de ces cellules.

Exemple 3 : Evaluation de l'activité *in vivo* de l'oligonucléotide (a)

15 Cinq lots de souris nude ont été utilisés. Il y avait 5 souris par lot.

Lot N° 1 : Ce lot a servi de témoin. Chaque souris est inoculée en sous-cutané à J0 avec 200  $\mu$ l d'une suspension de cellules de mélanome B16 (fournies par l'Institut Gustave Roussy de Villejuif) dispersées dans du PBS à raison de  $10^6$  cellules/ml. Ces souris ne sont pas traitées par la suite.

20 Lot N° 2 : Chaque souris est inoculée en sous-cutanée à J0 avec 200  $\mu$ l d'une suspension de cellules de mélanome B16 dispersées dans le PBS à raison de  $10^6$  cellules/ml.

A J1, J2 et J3 chaque souris reçoit une injection sous-cutanée de 200  $\mu$ l d'une solution d'oligonucléotide diluée dans le PBS à raison de 500  $\mu$ g/ml. L'injection  
25 d'oligonucléotide est effectuée à proximité du site d'injection des cellules.

Lot N° 3 : Les cellules de mélanome B16 utilisées pour inoculer les souris de ce lot ont été auparavant transfectées par l'oligonucléotide. Pour que s'opère la transfection, les cellules de mélanome B16 ont été suspendues dans une solution d'oligonucléotide dilué dans le PBS à raison de 500  $\mu$ g/ml pendant 2 heures à  
30 température ambiante. Après cette incubation chaque souris est inoculée à J0 avec 200  $\mu$ l de cette suspension de cellules transfectées dans le PBS à raison de  $10^6$  cellules/ml.

Lot N° 4 : Les cellules de mélanome B16 utilisées pour inoculer les souris de ce lot ont été, elles aussi, préalablement transfectées par l'oligonucléotide. Pour que  
35 s'opère la transfection, les cellules de mélanome B16 ont été suspendues dans une solution d'oligonucléotide dilué dans le PBS à raison de 500  $\mu$ g/ml pendant 2



heures à température ambiante. Après cette incubation, chaque souris est inoculée à J0 avec 200  $\mu$ l de cette suspension de cellules transfectées dans le PBS, à raison de  $10^6$  cellules/ml. A J1, J2 et J3 chaque souris reçoit une injection de 200  $\mu$ l d'une solution d'oligonucléotide dans le PBS à raison de 500  $\mu$ g/ml. L'injection est effectuée selon les mêmes modalités que pour le lot N° 2.

Lot N° 5 : Les souris de ce lot ne sont pas inoculées avec les cellules de mélanome B16. Cependant, chacune de ces souris reçoit une injection de 200  $\mu$ l d'une solution d'oligonucléotide dans le PBS à raison de 500  $\mu$ g/ml ; les injections sont faites à J1, J2 et J3.

Les résultats sont les suivants :

Après inoculation, chez les souris du lot N° 1, la masse tumorale se développe d'une façon très rapide. En effet, la masse tumorale atteint une taille de 1,6 à 2,5 cm de diamètre après dix jours chez les souris du lot N° 1 (souris non traitées).

L'évolution de la masse tumorale chez les souris du lot N° 2 (souris traitées après inoculation par injections d'oligonucléotide à J1, J2 et J3), comme chez les souris de lot N° 3 (souris inoculées avec des cellules de mélanome B16 préalablement transfectées par l'oligonucléotide) montre une moindre augmentation nette du volume de la masse tumorale. La masse tumorale chez les souris des lots 2 et 3 ne dépasse pas 1 cm de diamètre au dixième jour. Au quatorzième jour, la différence entre les souris des lots N° 2 et 3 d'une part, et les souris du lot N° 1 d'autre part, est remarquable.

Chez les souris du lot N° 4, on remarque qu'il n'y a pratiquement pas d'évolution de la masse tumorale jusqu'au quatorzième jour après l'inoculation des souris par les cellules de mélanome B16. Après cette période, chez certaines souris la masse tumorale commence à se développer alors que chez d'autres le développement de la masse tumorale n'est perceptible qu'au 40-42ème jour.

Chez les souris du lot N° 5 (souris n'ayant pas reçu de cellules de mélanome B16, mais traitées par injections d'oligonucléotide pendant trois jours) on note un effet général inattendu sur la peau. Il est identique à celui noté chez toutes les souris qui ont été traitées par l'oligonucléotide (lots 2 et 4). La peau prend un aspect vieilli, fripé. On note aussi l'apparition de poils chez toutes les souris traitées.

Il existe un parallélisme au cours de l'évolution entre la régression des signes cutanés et la reprise de la croissance tumorale.

On constate donc que la séquence d'acide nucléique (a) selon l'invention inhibe la multiplication des cellules de mélanome humain *in vitro* ; Il possède d'autre part

une activité anti-tumorale *in vivo* remarquable et permet même la repousse des poils chez la souris nude.

## LISTE DE SEQUENCES

## (1) INFORMATIONS GENERALES:

## (i) DEPOSANT:

- (A) NOM: SANOFI
- (B) RUE: 32/34 Rue Marbeuf
- (C) VILLE: PARIS
- (E) PAYS: FRANCE
- (F) CODE POSTAL: 75008
- (G) TELEPHONE: (1) 53 77 40 00
- (H) TELECOPIE: (1) 53 77 42 16

(ii) TITRE DE L' INVENTION: Séquence d'ADN à titre de médicament et compositions pharmaceutiques en contenant

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 21

## (iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0. Version #1.30 (OEB)

## (vi) DONNEES DE LA DEMANDE ANTERIEURE:

- (A) NUMERO DE LA DEMANDE: FR 95 05468
- (B) DATE DE DEPOT: 09-MAY-1995

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 48 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: OUI

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

TCGATGTGAC GCTACTGATG AGTCCGTGAG GACGAAACTC TGGCCTAG

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 45 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: OUI

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

TCGATGTGAC GCTACTGATG AGTCCGTGAG GACGAAACTC TGGCC

45

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 42 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: OUI

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

TCGATGTGAC GCTACTGATG AGTCCGTGAG GACGAAACTC TG

42

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 39 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: OUI

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

TCGATGTGAC GCTACTGATG AGTCCGTGAG GACGAAACT

39

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 36 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: OUI

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

TCGATGTGAC GCTACTGATG AGTCCGTGAG GACGAA

36

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 33 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: OUI

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

TCGATGTGAC GCTACTGATG AGTCCGTGAG GAC

33

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 7:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 30 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: OUI

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

TCGATGTGAC GCTACTGATG AGTCCGTGAG

30

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 8:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 27 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: OUI

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

TCGATGTGAC GCTACTGATG AGTCCGT

27

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 9:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 24 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: OUI

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

TCGATGTGAC GCTACTGATG AGTC

24

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 10:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 21 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: OUI

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

TCGATGTGAC GCTACTGATG A

21

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 11:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 45 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: OUI

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:

ATGTGACGCT ACTGATGAGT CCGTGAGGAC GAAACTCTGG CCTAG

45

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 12:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 42 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: OUI

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 12:

TGACGCTACT GATGAGTCCG TGAGGACGAA ACTCTGGCCT AG

42

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 13:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 39 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: OUI

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 13:

CGCTACTGAT GAGTCCGTGA GGACGAAACT CTGGCCTAG

39

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 14:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 36 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: OUI

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 14:

TACTGATGAG TCCGTGAGGA CGAAACTCTG GCCTAG

36

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 15:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 33 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: OUI

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 15:

TGATGAGTCC GTGAGGACGA AACTCTGGCC TAG

33

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 16:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 30 paires de bases

(B) TYPE: nucléotid

(C) NOMBRE DE BRINS: simpl

(D) CONFIGURATION: linéaire



(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: OUI

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 16:

TGAGTCCGTG AGGACGAAAC TCTGGCCTAG

30

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 17:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 27 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: OUI

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 17:

GTCCGTGAGG ACGAAACTCT GGCCTAG

27

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 18:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 24 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: OUI

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 18:

CGTGAGGACG AAACCTCTGGC CTAG

24

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 19:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 21 paires de bases

(B) TYPE: nucléotid

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: OUI

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 19:

GAGGACGAAA CTCTGGCCTA G

21

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 20:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 21 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: OUI

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 20:

TACTGATGAG TCCGTGAGGA C

21

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 21:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 21 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: OUI

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 21:

TGATGAGTCC GTGAGGACGA A

21

**REVENDICATIONS**

1. Séquence d'acide nucléique choisie parmi :  
(a) 5' -TCGATGTGAC GCTACTGATG AGTCCGTGAG GACGAAACTC TGGCCTAG- 3'  
5 (b) les fragments de (a) qui comportent au moins 21 bases ; et  
(c) les séquences d'acide nucléique qui hybrident dans des conditions strictes avec  
(a) ou (b),  
pour son utilisation comme substance thérapeutiquement active.
- 10 2. Séquence d'acide nucléique selon la revendication 1, dans laquelle tout ou partie  
des liaisons phosphodiester sont protégées.
3. Séquence d'acide nucléique selon la revendication 1 ou 2, dans laquelle  
l'extrémité 5'- et/ou 3'- est protégée.  
15
4. Agent anti-multiplication cellulaire, contenant à titre de principe actif la  
séquence d'acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 1 à 3.
5. Agent anti-tumoral, contenant à titre de principe actif la séquence d'acide  
20 nucléique selon l'une quelconque des revendications 1 à 3.
6. Agent anti-angiogénèse, contenant à titre de principe actif la séquence d'acide  
nucléique selon l'une quelconque des revendications 1 à 3.
- 25 7. Agent pour le traitement de la calvitie ou de l'alopecie, contenant à titre de  
principe actif la séquence d'acide nucléique selon l'une quelconque des  
revendications 1 à 3.
8. Composition pharmaceutique contenant, à titre de principe actif, la séquence  
30 d'acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, mélangée avec  
au moins un excipient pharmaceutiquement acceptable.
9. Outil de laboratoire constitué par la séquence d'acide nucléique selon l'une  
quelconque des revendications 1 à 3.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

national Application No  
PCT/FR 96/00691

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 C12N15/52 C12N9/00 C07H21/00 A61K31/70 //C07K14/47

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N A61K C07H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 269 (45). 1994. 27920-27924, XP002014191 QUON, M. ET AL.: "Insulin receptor substrate 1 mediates the stimulatory effect of insulin on GLUT4 translocation in transfected rat adipose cells." cited in the application	1,9
Y	see the whole document	2-5
Y	--- JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 268 (30). 1993. 22231-22234, XP002014192 WATERS, S. ET AL.: "Functional expression of insulin receptor substrate -1 is required for insulin-stimulated mitogenic signaling." see the whole document --- -/--	4,5

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

\*A\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 September 1996

Date of mailing of the international search report

22.10.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentsaan 2  
NL - 2220 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Andres, S

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 96/00691

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ERICKSON, R. & IZANT, J. 'GENE REGULATION: BIOLOGY OF ANTISENSE RNA AND DNA'; RAVEN PRESS, NEW YORK, US; 1992, pages 119-132, XP002014193 WICKSTROM, E.: "Antisense DNA therapeutics: neutral analogues and their stereochemistry" * Conclusions *	2,3
A	--- CHEMICAL REVIEWS, vol. 90, no. 4, 1 June 1990, pages 543-584, XP000141412 UHLMANN E ET AL: "ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES: A NEW THERAPEUTIC PRINCIPLE" see the whole document	2,3
T	--- CELL GROWTH AND DIFFERENTIATION, vol. 6, no. 5, 1 May 1995, pages 557-562, XP000560325 D'AMBROSIO, C. ET AL.: "TRANSFORMING POTENTIAL OF THE INSULIN RECEPTOR SUBSTRATE 1" see the whole document -----	4,5

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

F. n° internationale No  
PCT/FR. 96/00691

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 6 C12N15/52 C12N9/00 C07H21/00 A61K31/70 //C07K14/47

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 6 C12N A61K C07H

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 269 (45). 1994. 27920-27924, XP002014191 QUON, M. ET AL.: "Insulin receptor substrate 1 mediates the stimulatory effect of insulin on GLUT4 translocation in transfected rat adipose cells." cité dans la demande	1,9
Y	voir le document en entier	2-5
Y	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 268 (30). 1993. 22231-22234, XP002014192 WATERS, S. ET AL.: "Functional expression of insulin receptor substrate -1 is required for insulin-stimulated mitogenic signaling." voir le document en entier	4,5

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

25 Septembre 1996

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

22.10.96

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tél. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Andres, S

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No  
PCT/FR 96/00691

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>ERICKSON, R. &amp; IZANT, J. 'GENE REGULATION: BIOLOGY OF ANTISENSE RNA AND DNA'; RAVEN PRESS, NEW YORK, US; 1992, pages 119-132, XP002014193</p> <p>WICKSTROM, E.: "Antisense DNA therapeutics: neutral analogues and their stereochemistry"</p> <p>* Conclusions *</p> <p style="text-align: center;">---</p>	2,3
A	<p>CHEMICAL REVIEWS, vol. 90, no. 4, 1 Juin 1990, pages 543-584, XP000141412</p> <p>UHLMANN E ET AL: "ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES: A NEW THERAPEUTIC PRINCIPLE"</p> <p>voir le document en entier</p> <p style="text-align: center;">---</p>	2,3
T	<p>CELL GROWTH AND DIFFERENTIATION, vol. 6, no. 5, 1 Mai 1995, pages 557-562, XP000560325</p> <p>D'AMBROSIO, C. ET AL.: "TRANSFORMING POTENTIAL OF THE INSULIN RECEPTOR SUBSTRATE 1"</p> <p>voir le document en entier</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	4,5

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**